




Cytochrom P450 Monooxygenasen aus thermophilen Bakterien

Patent number: DE10051175
Publication date: 2002-05-02
Inventor: SCHMID ROLF (DE); HAUER BERNHARD (DE);
MERKL RAINER (DE); BLASCO FRANCESCA (DE)
Applicant: BASF AG (DE)
Classification:
- **international:** C12N9/02; C12N15/53; C07H21/04; C12N15/63;
C12N1/00; C12P1/00
- **european:** C12N9/02L15; C12P1/04
Application number: DE20001051175 20001016
Priority number(s): DE20001051175 20001016

Also published as:

 WO0233057 (A3)
 WO0233057 (A2)
 CA2425927 (A1)

Abstract of DE10051175

The invention relates to novel cytochrome P450 monooxygenases consisting of thermophilic bacteria, especially the species *Thermus* sp., nucleotide sequences coding for the same, the recombinant production of said monooxygenases and the use thereof for the microbiological oxidation of organic compounds.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 100 51 175 A 1**

⑳ Aktenzeichen: 100 51 175.9
㉔ Anmeldetag: 16. 10. 2000
㉕ Offenlegungstag: 2. 5. 2002

㉖ Int. Cl.⁷:
C 12 N 9/02
C 12 N 15/53
C 07 H 21/04
C 12 N 15/63
C 12 N 1/00
C 12 P 1/00

DE 100 51 175 A 1

㉗ Anmelder:
BASF AG, 67063 Ludwigshafen, DE

㉘ Vertreter:
Reitstötter, Kinzebach & Partner, 81679 München

㉙ Erfinder:
Hauer, Bernhard, Dr., 67136 Fußgönheim, DE;
Schmid, Rolf, Prof. Dr., 70329 Stuttgart, DE; Merkl,
Rainer, Dr., 37120 Bovenden, DE; Blasco, Francesca,
73734 Esslingen, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

㉚ Cytochrom P450 Monooxygenasen aus thermophilen Bakterien

㉛ Die Erfindung betrifft neuartige Cytochrom P450 Monooxygenasen aus thermophilen Bakterien, insbesondere der Gattung *Thermus* sp., dafür kodierende Nucleotidsequenzen, die rekombinante Herstellung dieser Monooxygenasen und deren Verwendung zur mikrobiologischen Oxidation organischer Verbindungen.

DE 100 51 175 A 1

[0001] Die Erfindung betrifft neuartige Cytochrom P450 Monooxygenasen aus thermophilen Bakterien, insbesondere der Gattung *Thermus* sp., dafür kodierende Nucleotidsequenzen, die rekombinante Herstellung dieser Monooxygenasen und deren Verwendung zur mikrobiologischen Oxidation organischer Verbindungen.

[0002] Cytochrom P450 Monooxygenasen besitzen die Fähigkeit technisch interessante Oxygenierungsreaktionen zu katalysieren und werden daher seit einiger Zeit intensiv untersucht. So wurde beispielsweise die Cytochrom P450 Monooxygenase BM-3 aus *Bacillus megaterium* isoliert und charakterisiert und ist mittlerweile auf rekombinantem Weg zugänglich (vgl. z. B. DE-A-199 35 115).

[0003] Diese Cytochrom P450-Monooxygenase katalysiert gewöhnlich die subterminale Hydroxylierung langkettiger, gesättigter Säuren und der entsprechenden Amide und Alkohole davon oder die Epoxydation ungesättigter langkettiger Fettsäuren oder gesättigter Fettsäuren mit mittlerer Kettenlänge. Die optimale Kettenlänge gesättigter Fettsäuren beträgt 14 bis 16 Kohlenstoffatome.

[0004] Die Struktur der Häm-Domäne von P450 BM-3 wurde durch Röntgenstrukturanalyse bestimmt. Die Substratbindungsstelle liegt in Form einer langen tunnelartigen Öffnung vor, welche von der Moleküloberfläche bis hin zum Häm-Molekül reicht und wird fast ausschließlich von hydrophoben Aminosäureresten begrenzt. Die einzigen geladenen Reste an der Oberfläche der Häm-Domäne sind die Reste Arg47 und Tyr51. Man nimmt an, daß diese an der Bindung der Carboxylatgruppe des Substrates durch Bildung einer Wasserstoffbrückenbindung beteiligt sind. Durch gezielte Einführung von Punktmutationen ist es zwischenzeitlich gelungen, das Substratspektrum dieses Enzyms zu erweitern. So können nunmehr auch kürzer- als auch länger-kettige Carbonsäuren, Alkane, Alkene, Cycloalkane, Cycloalkene und verschiedenste Aromaten durch dieses Enzym oxidiert werden (vgl. DE-A-199 35 115, 199 55 605, 100 11 723 und 100 14 085).

[0005] Um die industrielle Anwendbarkeit dieser Enzymklasse weiter zu verbessern, wäre es daher wünschenswert neue Cytochrom P450-Monooxygenasen zu finden, welche besser an industrielle Produktionsbedingungen angepasst sind, wie z. B. Enzyme mit erhöhter thermischer Stabilität.

[0006] Aufgabe der vorliegenden Erfindung war daher die Bereitstellung von Cytochrom P450-Monooxygenasen, welche besser an industrielle Produktionsbedingungen angepasst sind

[0007] Obige Aufgabe wurde gelöst durch Bereitstellung einer Cytochrom P450 Monooxygenase, die dadurch gekennzeichnet ist, dass sie eine Aminosäuresequenz aufweist, welche eine Teilsequenz von Aminosäurerest Pro328 bis Glu345 gemäß SEQ ID NO: 2 und vorzugsweise außerdem eine Teilsequenz von Aminosäurerest Val216 bis Ala227 gemäß SEQ ID NO: 2 umfasst.

[0008] Erfindungsgemäß bevorzugte Cytochrom P450 Monooxygenasen weisen eine Aminosäuresequenz auf, welche wenigstens eine weitere Teilsequenz umfasst, die ausgewählt ist unter einer Teilsequenzen von wenigstens 10 aufeinanderfolgenden Aminosäure aus den durch die Aminosäurereste Met1 bis Phe327 und Gly346 bis Ala389 gemäß SEQ ID NO: 2 vorgegebenen Sequenzbereichen.

[0009] Eine besonders bevorzugte Cytochrom P450 Monooxygenase besitzt eine Aminosäuresequenz, welche im wesentlichen SEQ ID NO: 2 entspricht.

[0010] Erfindungsgemäße Cytochrom P450 Monooxygenasen sind insbesondere aus thermophilen Bakterien, vorzugsweise der Gattung *Thermus* sp., wie z. B. der Spezies *Thermus thermophilus*, Stamm HB27 (hinterlegt bei der DSM unter der Nummer DSM7039) isolierbar. "Thermophile" Bakterien erfüllen erfindungsgemäß die Temperaturtoleranzkriterien nach H. G. Schlegel, Allgemeine Mikrobiologie, Thieme Verlag Stuttgart, 5. Auflage, Seite 173, für thermophile und extrem thermophile Organismen (d. h. Wachstumsoptimum bei über 40°C).

[0011] Die erfindungsgemäßen Monooxygenase sind vorzugsweise durch eine erhöhte Temperaturstabilität gekennzeichnet. Diese drückt sich in einem in Vergleich zum P450 BM-3 aus *Bacillus megaterium* geringeren Aktivitätsverlust bei erhöhter Temperatur (z. B. in einem Bereich von 30 bis 60°C, pH 7,5, 25 mM Tris/HCl) aus.

[0012] Gegenstand der Erfindung sind weiterhin Oligonukleotide, welche mit einer Nukleinsäuresequenz hybridisieren, die für eine erfindungsgemäße Cytochrom P450 Monooxygenase kodiert.

[0013] Insbesondere sind Gegenstand der Erfindung auch solche Oligonukleotide, welche eine Nukleinsäuresequenz umfassen, die im wesentlichen komplementär ist zu einem wenigstens 30 bis 45 aufeinanderfolgende Nukleotidreste umfassenden Nukleotidsequenzbereich gemäß SEQ ID NO: 1.

[0014] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft Polynukleotide, welche mit einem Oligonukleotid gemäß obiger Definition hybridisieren und für eine Cytochrom P450 Monooxygenase kodieren, insbesondere eine Cytochrom P450 Monooxygenase aus anderen Mikroorganismen, wie z. B. solchen der Gattung *Thermus* sp.

[0015] Gegenstand der Erfindung sind insbesondere auch Polynukleotide, welche eine Nukleinsäuresequenz gemäß obiger Definition kodieren, sowie dazu komplementäre Polynukleotide.

[0016] Bevorzugte Polynukleotide sind solche, die im wesentlichen eine Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 1 besitzen, sowie die dazu komplementären und davon abgeleiteten Nukleinsäuresequenzen.

[0017] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft Expressionskassetten zur rekombinanten Herstellung erfindungsgemäßer Monooxygenasen, umfassend wenigstens eine regulatorische Nukleinsäuresequenz operativ verknüpft mit wenigstens einer der oben angegebenen Polynukleotide.

[0018] Weiter Gegenstände der Erfindung betreffen rekombinanter Vektoren, welche wenigstens ein Polynukleotid oder wenigstens eine Expressionskassette gemäß obiger Definition tragen; sowie Mikroorganismus, enthaltend wenigstens einen solchen rekombinanten Vektor; sowie Verfahren zur Herstellung erfindungsgemäßer Cytochrom P450 Monooxygenasen, bei welchen man einen Mikroorganismus, welcher Cytochrom P450 Monooxygenase produziert, kultiviert und die Monooxygenase aus der Kultur isoliert.

[0019] Die erfindungsgemäßen Enzyme und davon ableitbaren Mutanten sind als Biokatalysatoren für unterschiedliche biochemische Oxygenierungsreaktionen organischer Verbindungen von technischer Bedeutung brauchbar. In analoger Weise sind auch die erfindungsgemäßen rekombinanten Mikroorganismen zur Durchführung solcher Oxygenie-

rungsreaktionen einsetzbar.

[0020] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft daher ein Verfahren zur mikrobiologischen Oxidation einer organischen Verbindung, wobei man diese Verbindung mit wenigstens einer erfindungsgemäßen Cytochrom P450 Monooxygenase umsetzt.

[0021] Vorzugsweise wird dieses Verfahren so durch geführt, dass man

- a1) einen rekombinanten Mikroorganismus gemäß obiger Definition in einem Kulturmedium, in Gegenwart der exogenen (von außen zugesetzten) oder intermediär gebildeten organischen Verbindung, welche ein Substrat der Monooxygenase ist, vorzugsweise in Gegenwart von Sauerstoff und gegebenenfalls einem Elektronendonator, kultiviert; oder
- a2) ein Substrat-haltiges Reaktionsmedium, vorzugsweise in Gegenwart von Sauerstoff und einem Elektronendonator, mit einer erfindungsgemäßen Cytochrom P450 Monooxygenase inkubiert; und
- b) das gebildete Oxidationsprodukt oder ein Folgeprodukt davon aus dem Medium isoliert.

[0022] Das exogene oder intermediär gebildete Substrat kann dabei ausgewählt sein unter:

- a) gegebenenfalls substituierten N-, O- oder S-heterocyclischen ein-, zwei- oder mehrkernigen aromatischen Verbindungen;
- b) gegebenenfalls substituierten ein- oder mehrkernigen Aromaten;
- c) geradkettigen oder verzweigten Alkanen und Alkenen;
- d) gegebenenfalls substituierten Cycloalkanen und Cycloalkenen; und
- e) aliphatischen, vorzugsweise terminal gesättigten, Carbonsäuren.

[0023] Nach einer ersten bevorzugten Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die Oxidation durch Kultivierung der Mikroorganismen in Gegenwart von Sauerstoff bei einer Kultivierungstemperatur von mindestens etwa 20°C und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9 durchführt.

[0024] Nach einer zweiten bevorzugten Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens setzt man als exogenes Substrat wenigstens eine Verbindung, ausgewählt unter den oben definierten Gruppen a) bis e), einem Medium zu und führt die Oxidation durch enzymatische Umsetzung des substrathaltigen Mediums in Gegenwart von Sauerstoff bei einer Temperatur von mindestens etwa 20°C und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9 durch, wobei das substrathaltige Medium außerdem bezogen auf das Substrat einen etwa 10- bis 100-fachen molaren Überschuß an Reduktionsäquivalenten (Elektronendonator) enthält.

[0025] Obige Verfahren können bevorzugt in Bioreaktoren durchgeführt werden. Gegenstand der Erfindung sind daher solche Bioreaktoren, umfassend wenigstens eine erfindungsgemäße Monooxygenase oder wenigstens einen rekombinanten Mikroorganismus, gegebenenfalls jeweils in immobilisierter Form.

[0026] Schließlich betrifft die Erfindung die Verwendung einer Cytochrom P450 Monooxygenase, eines Vektors oder eines Mikroorganismus gemäß vorliegender Erfindung zur mikrobiologischen Oxidation oben genannter organischer Verbindungsklassen.

[0027] Die Erfindung wird nun unter Bezugnahme auf beiliegenden Figuren näher erläutert. Dabei zeigt

[0028] Fig. 1 einen Sequenzvergleich von P450 aus *Thermus thermophilus* mit der Häm-Domäne von P450 BM3 aus *Bacillus megaterium*. Doppelt unterstrichen ist dabei die Häm-Bindungsstelle gezeigt (Cys400 in P450 BM3 ist der Cysteinrest, der mit dem Eisenatom der prosthetischen Gruppe koordiniert). Einfach unterstrichen ist die Region die in Kontakt steht mit dem ω -Ende der Fettsäurekette. Die Grad der Übereinstimmung ist durch verschiedenen Symbole gekennzeichnet ("*" – identische Reste; ":" und "." = ähnliche Reste).

[0029] Fig. 2 zeigt das Ergebnis eines Vergleichstests zur Bestimmung der Thermostabilität von P450 BM3 und P450 aus *Thermus* sp.. Die Thermostabilität wurde spektrometrisch im Wellenlängenbereich zwischen 400 und 500 nm über den Häm-Gruppen-Gehalt bestimmt.

[0030] Erfindungsgemäß mit umfasst sind ebenfalls "funktionale Äquivalente" der konkret offenbarten neuen P450 Monooxygenasen.

[0031] "Funktionale Äquivalente" oder Analoga der konkret offenbarten Monooxygenasen sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung davon verschiedene Enzyme, welche weiterhin die gewünschte Substratspezifität im Rahmen wenigstens einer der oben bezeichneten Oxidationsreaktionen a) bis e) besitzen und/oder im Vergleich zu P450 BM3 eine erhöhte Thermostabilität, z. B. bei Temperaturen im Bereich von etwa 30 bis 60°C und gegebenenfalls höheren Temperaturen nach 30-minütiger Behandlung in 25 mM Tris/HCl, besitzen.

[0032] Unter "funktionalen Äquivalenten" versteht man erfindungsgemäß insbesondere Mutanten, welche in wenigstens einer der oben genannten Sequenzpositionen eine andere als die konkret genannte Aminosäure aufweisen aber trotzdem eine der oben genannten Oxidationsreaktionen katalysieren. "Funktionale Äquivalente" umfassen somit die durch eine oder mehrere Aminosäure-Additionen, -Substitutionen, -Deletionen und/oder -Inversionen erhältlichen Mutanten, wobei die genannten Veränderungen in jeglicher Sequenzposition auftreten können, solange sie zu einer Mutante mit dem erfindungsgemäßen Eigenschaftsprofil führen. Funktionale Äquivalenz ist insbesondere auch dann gegeben, wenn die Reaktivitätsmuster zwischen Mutante und unverändertem Enzym qualitativ übereinstimmen, d. h. beispielsweise gleiche Substrate mit unterschiedlicher Geschwindigkeit umgesetzt werden.

[0033] "Funktionale Äquivalente" umfassen natürlich auch P450-Monooxygenasen, welche aus anderen Organismen, z. B. aus anderen als den hierin konkret genannten Bakterien, zugänglich sind, sowie natürlich vorkommende Varianten. Beispielsweise lassen sich durch Sequenzvergleich Bereiche homologer Sequenzregionen festlegen und in Anlehnung an die konkreten Vorgaben der Erfindung äquivalente Enzyme ermitteln.

[0034] Erfindungsgemäß oxidierbare Substrate der Gruppe a) sind gegebenenfalls substituierte heterocyclische ein-, zwei- oder mehrkernigen aromatischen Verbindungen; insbesondere oxidierbare oder hydroxylierbare N-, O- oder S-he-

terocyclische ein-, zwei- oder mehrkernige aromatische Verbindungen. Sie umfassen z. B. zwei oder drei vier- bis siebengliedrige, insbesondere sechs- oder fünfgliedrige, kondensierte Ringe, wobei wenigstens einer, vorzugsweise alle Ringe aromatischen Charakter besitzen und wobei wenigstens einer der aromatischen Ringe ein bis drei, vorzugsweise ein N-, O- oder S-Heteroatom im Ring trägt. In der gesamten Ringstruktur können gegebenenfalls ein oder zwei weitere gleiche oder verschiedene Heteroatome enthalten sein. Die aromatischen Verbindungen können weiterhin 1 bis 5 Substituenten an den Ring-Kohlenstoff- oder an den Heteroatomen tragen. Beispiele für geeignete Substituenten sind C₁ bis C₄-Alkyl, wie Methyl, Ethyl, n- oder i-Propyl oder n-, i- oder t-Butyl oder C₂ bis C₄-Alkenyl, wie Ethenyl, 1-Propenyl, 2-Propenyl, 1-Butenyl, 2-Butenyl oder 3-Butenyl, Hydroxyl und Halogen, wie F, Cl, und Br. Die genannten Alkyl- oder Alkenylsubstituenten können gegebenenfalls auch eine Keto- oder Aldehydgruppe aufweisen; Beispiele hierfür sind Propan-2-on-3-yl, Butan-2-on-4-yl, 3-Buten-2-on-4-yl. Nichtlimitierende Beispiele für geeignete heterocyclische Substrate sind insbesondere zweikernige Heterocyclen, wie Indol, N-Methylindol und die mit ein bis drei Substituenten an Kohlenstoffatomen substituierten Analoga davon, wie z. B. 5-Chlor- oder 5-Brom-indol; sowie Chinolin und Chinolinderivate, wie z. B. 8-Methylchinolin, 6-Methylchinolin und Chinaldin; und Benzothiophen und die mit ein bis drei Substituenten an Kohlenstoffatomen substituierten Analoga davon. Außerdem seien genannt dreikernige Heteroaromaten, wie Acridin, und die mit ein bis drei Substituenten an Kohlenstoffatomen substituierten Analoga davon.

[0035] Erfindungsgemäß oxidierbare Substrate der Gruppe b) sind gegebenenfalls substituierte ein- oder mehrkernige, insbesondere ein- oder zweikernige Aromaten, wie Benzol und Naphthalin. Die aromatischen Verbindungen können gegebenenfalls ein oder mehrfach substituiert sein und z. B. 1 bis 5 Substituenten an den Ring-Kohlenstoffatomen tragen. Beispiele für geeignete Substituenten sind C₁ bis C₄-Alkyl, wie Methyl, Ethyl, n- oder i-Propyl oder n-, i- oder t-Butyl, oder C₂ bis C₄-Alkenyl, wie Ethenyl, 1-Propenyl, 2-Propenyl, 1-Butenyl, 2-Butenyl oder 3-Butenyl, Hydroxyl und Halogen, wie F, Cl, und Br. Die genannten Alkyl- oder Alkenylsubstituenten können gegebenenfalls auch eine Keto- oder Aldehydgruppe aufweisen; Beispiele hierfür sind Propan-2-on-3-yl, Butan-2-on-4-yl, 3-Buten-2-on-4-yl. Der Aromat kann gegebenenfalls mit einem vier- bis siebengliedrigen, nichtaromatischen Ring kondensiert sein. Der nichtaromatische Ring kann gegebenenfalls eine oder zwei C-C-Doppelbindungen aufweisen, ein- oder mehrfach mit oben genannten Substituenten substituiert sein und gegebenenfalls ein oder zwei Ringheteroatome tragen. Beispiele für besonders brauchbare Aromaten sind einkernige Aromaten, wie Cumol, sowie zweikernige Substrate, wie Inden und Naphthalin, sowie die mit ein bis drei Substituenten an Kohlenstoffatomen substituierten Analoga davon.

[0036] Erfindungsgemäß oxidierbare Substrate der Gruppe c) sind geradkettige oder verzweigte Alkane oder Alkene mit 4 bis 15, vorzugsweise 6 bis 12 Kohlenstoffatomen. Als Beispiele können genannt werden n-Pentan, n-Hexan, n-Heptan-, n-Oktan, n-Nonan, n-Decan, n-Undecan und n-Dodecan, sowie die ein- oder mehrfach verzweigten Analoga dieser Verbindungen, wie z. B. analoge Verbindungen mit 1 bis 3 Methyl-Seitengruppen; oder die ein- oder mehrfach, beispielsweise einfach ungesättigten Analoga der oben genannten Alkane.

[0037] Erfindungsgemäß oxidierbare Substrate der Gruppe d) sind gegebenenfalls substituierte Cycloalkane und Cycloalkene. Beispiele hierfür sind Cyclopentan, Cyclopenten, Cyclohexan, Cyclohexen, Cycloheptan und Cyclohepten. Die Ringstruktur kann dabei ein- oder mehrfach substituiert sein und z. B. 1 bis 5 Substituenten gemäß obiger Definition für Verbindungen der Gruppen a) und b) tragen. Nichtlimitierendes Beispiel hierfür sind Ionone, wie α -, β - und γ -Ionon, sowie die entsprechenden Methylionone und Isomethylionone.

[0038] Erfindungsgemäß oxidierbare, Substrate der Gruppe e) sind geradkettige oder verzweigte, gesättigte oder ein- oder mehrfach ungesättigte C₈-C₃₀-Carbonsäuren, insbesondere Monocarbonsäuren, oder Carbonsäurederivate davon, wie Ester und Amide. Als Beispiele sind terminal oder subterminal (ω -1-, ω -2- oder ω -3-Position) hydroxylierbare gesättigte Monocarbonsäuren zu nennen.

[0039] Gegenstand der Erfindung sind auch Nukleinsäuresequenzen (einzel- und doppelsträngige DNA- und RNA-Sequenzen), kodierend für eine der obigen Monooxygenasen und deren funktionalen Äquivalenten. Weitere erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenzen sind abgeleitet von SEQ ID NO: 1 und unterscheiden sich davon durch Addition, Substitution, Insertion oder Deletion einzelner oder mehrerer Nukleotide, kodieren aber weiterhin für eine Monooxygenase mit der gewünschten Eigenschaftsprofil.

[0040] Erfindungsgemäß umfasst sind auch solche Nukleinsäuresequenzen, die sogenannte stumme Mutationen umfassen oder entsprechend der Codon-Nutzung eines speziellen Ursprungs- oder Wirtsorganismus, im Vergleich zu einer konkret genannten Sequenz verändert sind, ebenso wie natürlich vorkommende Varianten, wie z. B. Spleißvarianten, davon. Gegenstand sind ebenso durch konservative Nukleotidsubstitutionen (d. h. die betreffende Aminosäure wird durch eine Aminosäure gleicher Ladung, Größe, Polarität und/oder Löslichkeit ersetzt) erhältliche Sequenzen.

[0041] Weiterhin umfasst die Erfindung auch Nukleinsäuresequenzen, welchen mit oben genannten kodierenden Sequenzen hybridisieren oder dazu komplementär sind. Diese Polynukleotide lassen sich bei Durchmusterung von genomischen oder cDNA-Bibliotheken auffinden und gegebenenfalls daraus mit geeigneten Primern mittels PCR vermehren und anschließend beispielsweise mit geeigneten Sonden isolieren. Eine weitere Möglichkeit bietet die Transformation geeigneter Mikroorganismen mit erfindungsgemäßen Polynukleotiden oder Vektoren, die Vermehrung der Mikroorganismen und damit der Polynukleotide und deren anschließende Isolierung. Darüber hinaus können erfindungsgemäße Polynukleotide auch auf chemischem Wege synthetisiert werden.

[0042] Unter der Eigenschaft, an Polynukleotide "hybridisieren" zu können, versteht man die Fähigkeit eines Poly- oder Oligonukleotids unter stringenten Bedingungen an eine nahezu komplementäre Sequenz zu binden, während unter diesen Bedingungen unspezifische Bindungen zwischen nicht-komplementären Partnern unterbleiben. Dazu sollten die Sequenzen zu 70–100%, vorzugsweise zu 90–100%, komplementär sein. Die Eigenschaft komplementärer Sequenzen, spezifisch aneinander binden zu können, macht man sich beispielsweise in der Northern- oder Southern-Blot-Technik oder bei der Primerbindung in PCR oder RT-PCR zunutze. Üblicherweise werden dazu Oligonukleotide ab einer Länge von 30 Basenpaaren eingesetzt. Unter stringenten Bedingungen versteht man beispielsweise in der Northern-Blot-Technik die Verwendung einer 50–70°C, vorzugsweise 60–65°C warmen Waschlösung, beispielsweise 0,1 \times SSC-Puffer mit 0,1% SDS (20 \times SSC: 3M NaCl, 0,3M Na-Citrat, pH 7,0) zur Elution unspezifisch hybridisierter cDNA-Sonden oder Oligonukleotide. Dabei bleiben, wie oben erwähnt, nur in hohem Maße komplementäre Nukleinsäuren aneinander ge-

bunden.

[0043] Gegenstand der Erfindung sind außerdem Expressionskonstrukte, enthaltend unter der genetischen Kontrolle regulatorischer Nukleinsäuresequenzen eine für eine erfindungsgemäße Mutante kodierende Nukleinsäuresequenz; sowie Vektoren, umfassend wenigstens eines dieser Expressionskonstrukte. Vorzugsweise umfassen solche erfindungsgemäßen Konstrukte 5'-stromaufwärts von der jeweiligen kodierenden Sequenz einen Promotor und 3'-stromabwärts eine Terminatorsequenz sowie gegebenenfalls weitere übliche regulative Elemente, und zwar jeweils operativ verknüpft mit der kodierenden Sequenz. Unter einer "operativen Verknüpfung" versteht man die sequentielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und gegebenenfalls weiterer regulativer Elemente derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann. Beispiele für operativ verknüpfbare Sequenzen sind Targeting-Sequenzen sowie Translationsverstärker, Enhancer, Polyadenylierungssignale und dergleichen. Weitere regulative Elemente umfassen selektierbare Marker, Amplifikationssignale, Replikationsursprünge und dergleichen.

[0044] Zusätzlich zu den künstlichen Regulationssequenzen kann die natürliche Regulationssequenz vor dem eigentlichen Strukturen noch vorhanden sein. Durch genetische Veränderung kann diese natürliche Regulation gegebenenfalls ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht oder erniedrigt werden. Das Genkonstrukt kann aber auch einfacher aufgebaut sein, das heißt es werden keine zusätzlichen Regulationssignale vor das Strukturen inseriert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation wird nicht entfernt. Statt dessen wird die natürliche Regulationssequenz so mutiert, dass keine Regulation mehr erfolgt und die Genexpression gesteigert oder verringert wird.

[0045] Die Nukleinsäuresequenzen können in einer oder mehreren Kopien im Genkonstrukt enthalten sein.

[0046] Beispiele für brauchbare Promotoren sind: *cos*-, *tac*-, *trp*-, *tet*-, *trp-tet*-, *lpp*-, *lac*-, *lpp-lac*-, *lacIq*-, *T7*-, *T5*-, *T3*-, *gal*-, *trc*-, *ara*-, *SP6*-, *l-PR*- oder im *l-PL*-Promotor, die vorteilhafterweise in gram-negativen Bakterien Anwendung finden; sowie die gram-positiven Promotoren *amy* und *SPO2*, die Hefepromotoren *ADC1*, *MFa*, *AC*, *P-60*, *CYC1*, *GAPDH* oder die Pflanzenpromotoren *CaMV/35S*, *SSU*, *OCS*, *lib4*, *usp*, *STLS1*, *B33*, *not* oder der Ubiquitin- oder Phaseolin-Promotor. Besonders bevorzugt ist die Verwendung induzierbarer Promotoren, wie z. B. licht- und insbesondere temperaturinduzierbarer Promotoren, wie der *P₁P₁*-Promotor.

[0047] Prinzipiell können alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen verwendet werden. Darüber hinaus können auch synthetische Promotoren vorteilhaft verwendet werden.

[0048] Die genannten regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Nukleinsäuresequenzen und der Proteinexpression ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus bedeuten, dass das Gen erst nach Induktion exprimiert oder überexprimiert wird, oder dass es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird.

[0049] Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei vorzugsweise die Expression positiv beeinflussen und dadurch erhöhen oder erniedrigen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird.

[0050] Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten Monooxygenase-Nukleotidsequenz sowie einem Terminator- oder Polyadenylierungssignal. Dazu verwendet man gängige Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E. F. Fritsch und J. Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T. J. Silhavy, M. L. Berman und L. W. Enquist, *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F. M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience (1987) beschrieben sind.

[0051] Das rekombinante Nukleinsäurekonstrukt bzw. Genkonstrukt wird zur Expression in einem geeigneten Wirtsorganismus vorteilhafterweise in einen wirtsspezifischen Vektor inseriert, der eine optimale Expression der Gene im Wirt ermöglicht. Vektoren sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus "Cloning Vectors" (Pouwels P. H. et al., Hrsg., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985) entnommen werden. Unter Vektoren sind außer Plasmiden auch alle anderen dem Fachmann bekannten Vektoren, wie beispielsweise Phagen, Viren, wie SV40, CMV, Baculovirus und Adenovirus, Transposons, IS-Elemente, Phasme, Cosmide, und lineare oder zirkuläre DNA zu verstehen. Diese Vektoren können autonom im Wirtsorganismus repliziert oder chromosomal repliziert werden.

[0052] Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Vektoren sind rekombinante Mikroorganismen herstellbar, welche beispielsweise mit wenigstens einem erfindungsgemäßen Vektor transformiert sind und zur Produktion der Mutanten eingesetzt werden können. Vorteilhafterweise werden die oben beschriebenen erfindungsgemäßen rekombinanten Konstrukte in ein geeignetes Wirtssystem eingebracht und exprimiert. Dabei werden vorzugsweise dem Fachmann bekannte geläufige Klonierungs- und Transfektionsmethoden, wie beispielsweise Co-Präzipitation, Protoplastenfusion, Elektroporation, retrovirale Transfektion und dergleichen, verwendet, um die genannten Nukleinsäuren im jeweiligen Expressionssystem zur Expression zu bringen. Geeignete Systeme werden beispielsweise in *Current Protocols in Molecular Biology*, F. Ausubel et al., Hrsg., Wiley Interscience, New York 1997, beschrieben.

[0053] Als Wirtsorganismen sind prinzipiell alle Organismen geeignet, die eine Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, ihrer Allelvarianten, ihrer funktionellen Äquivalente oder Derivate ermöglichen. Unter Wirtsorganismen sind beispielsweise Bakterien, Pilze, Hefen, pflanzliche oder tierische Zellen zu verstehen. Bevorzugte Organismen sind Bakterien, wie solche der Gattung *Escherichia*, wie z. B. *Escherichia coli*, *Streptomyces*, *Bacillus* oder *Pseudomonas*, eukaryotische Mikroorganismen, wie *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus*, höhere eukaryotische Zellen aus Tieren oder Pflanzen, beispielsweise Sf9 oder CHO-Zellen.

[0054] Die Selektion erfolgreich transformierter Organismen kann durch Markergene erfolgen, die ebenfalls im Vektor oder in der Expressionskassette enthalten sind. Beispiele für solche Markergene sind Gene für Antibiotikaresistenz und für Enzyme, die eine farbgebende Reaktion katalysieren, die ein Anfärben der transformierten Zelle bewirkt. Diese können dann mittels automatischer Zellsortierung selektiert werden. Erfolgreich mit einem Vektor transformierte Mikroorganismen, die ein entsprechendes Antibiotikaresistenzgen (z. B. G418 oder Hygromycin) tragen, lassen sich durch ent-

sprechende Antibiotikaenthaltende Medien oder Nährböden selektieren. Markerproteine, die an der Zelloberfläche präsentiert werden, können zur Selektion mittels Affinitätschromatographie genutzt werden.

[0055] Die Kombination aus den Wirtsorganismen und den zu den Organismen passenden Vektoren, wie Plasmide, Viren oder Phagen, wie beispielsweise Plasmide mit dem RNA-Polymerase/Promoter-System, die Phagen λ oder μ oder andere temperente Phagen oder Transposons und/oder weiteren vorteilhaften regulatorischen Sequenzen bildet ein Expressionssystem. Beispielsweise ist unter dem Begriff "Expressionssystem" die Kombination aus Säugetierzellen, wie CHO-Zellen, und Vektoren, wie pcDNA3neo-Vektor, die für Säugetierzellen geeignet sind, zu verstehen.

[0056] Gewünschtenfalls kann das Genprodukt auch in transgenen Organismen wie transgenen Tieren, wie insbesondere Mäusen, Schafen oder transgenen Pflanzen zur Expression gebracht werden.

[0057] Gegenstand der Erfindung sind weiterhin Verfahren zur rekombinanten Herstellung einer erfindungsgemäßen Monooxygenase, wobei man einen Monooxygenase-produzierenden Mikroorganismus kultiviert, gegebenenfalls die Expression der Monooxygenase induziert und die Monooxygenase aus der Kultur isoliert. Die Monooxygenase kann so auch in großtechnischem Maßstab produziert werden, falls dies erwünscht ist.

[0058] Der rekombinante Mikroorganismus kann nach bekannten Verfahren kultiviert und fermentiert werden. Bakterien können beispielsweise in TB- oder LB-Medium und bei einer Temperatur von 20 bis 40°C und einem pH-Wert von 6 bis 9 vermehrt werden. Im Einzelnen werden geeignete Kultivierungsbedingungen beispielsweise in T. Maniatis, E. F. Fritsch and J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) beschrieben.

[0059] Die Zellen werden dann, falls die Monooxygenase nicht in das Kulturmedium sezerniert wird, aufgeschlossen und das Enzym nach bekannten Proteinisolierungsverfahren aus dem Lysat gewonnen. Die Zellen können wahlweise durch hochfrequenten Ultraschall, durch hohen Druck, wie z. B. in einer French-Druckzelle, durch Osmolyse, durch Einwirkung von Detergenzien, lytischen Enzymen oder organischen Lösungsmitteln, durch Homogenisatoren oder durch Kombination mehrerer der aufgeführten Verfahren aufgeschlossen werden.

[0060] Eine Aufreinigung der Monooxygenase kann mit bekannten, chromatographischen Verfahren erzielt werden, wie Molekularsieb-Chromatographie (Gelfiltration), wie Q-Sepharose-Chromatographie, Ionenaustausch-Chromatographie und hydrophobe Chromatographie, sowie mit anderen üblichen Verfahren wie Ultrafiltration, Kristallisation, Ausfällen, Dialyse und nativer Gelelektrophorese. Geeignete Verfahren werden beispielsweise in Cooper, F. G., Biochemische Arbeitsmethoden, Verlag Walter de Gruyter, Berlin, New York oder in Scopes, R., Protein Purification, Springer Verlag, New York, Heidelberg, Berlin beschrieben.

[0061] Besonders vorteilhaft ist es, zur Isolierung des rekombinanten Proteins Vektorsysteme oder Oligonukleotide zu verwenden, die die cDNA um bestimmte Nucleotidsequenzen verlängern und damit für veränderte Polypeptide oder Fusionsproteine kodieren, die einer einfacheren Reinigung dienen. Derartige geeignete Modifikationen sind beispielsweise als Anker fungierende sogenannte "Tags", wie z. B. die als Hexa-Histidin-Anker bekannte Modifikation oder Epitope, die als Antigene von Antikörpern erkannt werden können (beschrieben zum Beispiel in Harlow, E. and Lane, D., 1988, Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor (N. Y.) Press). Diese Anker können zur Anheftung der Proteine an einen festen Träger, wie z. B. einer Polymermatrix, dienen, die beispielsweise in einer Chromatographiesäule eingefüllt sein kann, oder an einer Mikrotiterplatte oder an einem sonstigen Träger verwendet werden kann.

[0062] Gleichzeitig können diese Anker auch zur Erkennung der Proteine verwendet werden. Zur Erkennung der Proteine können außerdem übliche Marker, wie Fluoreszenzfarbstoffe, Enzymmarker, die nach Reaktion mit einem Substrat ein detektierbares Reaktionsprodukt bilden, oder radioaktive Marker, allein oder in Kombination mit den Ankern zur Derivatisierung der Proteine verwendet werden.

[0063] Die Erfindung betrifft außerdem ein Verfahren zur mikrobiologischen Oxidation organischer Verbindungen obigen Typs.

[0064] Wird die Umsetzung mit einem rekombinanten Mikroorganismus durchgeführt, so erfolgt vorzugsweise zunächst die Kultivierung der Mikroorganismen in Gegenwart von Sauerstoff und in einem Komplexmedium, wie z. B. TB- oder LB-Medium bei einer Kultivierungstemperatur von etwa 20°C oder mehr, und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9, bis eine ausreichende Zelldichte erreicht ist. Um die Oxidationsreaktion besser steuern zu können, bevorzugt man die Verwendung eines induzierbaren Promotors. Die Kultivierung wird nach Induktion der Monooxygenaseproduktion in Gegenwart von Sauerstoff 12 Stunden bis 3 Tage fortgesetzt.

[0065] Wird die erfindungsgemäße Umsetzung dagegen mit gereinigtem oder angereichertem Enzym durchgeführt so löst man das erfindungsgemäße Enzym in einem exogenes Substrat enthaltenden Medium (etwa 0,01 bis 10 mM, oder 0,05 bis 5 mM), und führt die Umsetzung, vorzugsweise in Gegenwart von Sauerstoff, bei einer Temperatur von etwa 10°C oder mehr, und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9 (wie z. B. eingestellt mit 100 bis 200 mM Phosphat- oder Tris-Puffer), sowie in Gegenwart eines Reduktionsmittels durch, wobei das Substrat-haltige Medium außerdem bezogen auf das zu oxidierende Substrat einen etwa 10- bis 100-fachen molaren Überschuß an Reduktionsäquivalenten enthält. Bevorzugtes Reduktionsmittel ist NADPH.

[0066] Beim erfindungsgemäßen Substratoxidationsprozess wird im Reaktionsmedium enthaltener oder zugesetzter Sauerstoff reduktiv enzymatisch gespalten. Die erforderlichen Reduktionsäquivalente werden von dem zugesetzten Reduktionsmittel (Elektronendonator) zur Verfügung gestellt.

[0067] Das gebildete Oxidationsprodukt kann dann in herkömmlicher Weise, wie z. B. durch Extraktion oder Chromatographie, vom Medium abgetrennt und gereinigt werden.

[0068] Folgende nichtlimitierende Beispiele beschreiben spezielle Ausführungsformen der Erfindung.

Allgemeine experimentelle Angaben

65

a) Allgemeine Klonierungsverfahren

[0069] Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeführten Klonierungsschritte wie z. B. Restriktionsspaltung-

DE 100 51 175 A 1

gen, Agarose Gelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylonmembranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von E. coli Zellen, Anzucht von Bakterien, Vermehrung von Phagen und Sequenzanalyse rekombinanter DNA wurden wie bei Sambrook et al. (1989) a. a. O. beschrieben durchgeführt.

5

b) Polymerasekettenreaktion (PCR)

[0070] PCR wurde nach Standardprotokoll mit folgendem Standardansatz durchgeführt:

8 µl dNTP-Mix (200 µM), 10 µl Taq-Polymerase-Puffer (10 x) ohne MgCl₂, 8 µl MgCl₂ (25 mM, je 1 µl Primer (0,1 µM), 1 µl zu amplifizierende DNA, 2,5 U Taq-Polymerase (MBI Fermentas, Vilnius, Litauen), ad 100 µl demineralisiertes Wasser.

10

c) Kultivierung von E. coli

[0071] Die Kultivierung von rekombinanten E. coli-Stämme DH5α wurde in LB-Amp Medium (Trypton 10,0 g, NaCl 5,0 g, Hefeextrakt 5,0 g, Ampicillin 100 g/ml H₂O ad 1000 ml) bei 37°C kultiviert. Dazu wurde jeweils eine Kolonie mittels Impföse von einer Agarplatte in 5 ml LB-Amp überführt. Nach ca. 18 h Stunden Kultivierung bei einer Schüttelfrequenz von 220 Upm wurden 400 ml Medium in einem 2-l-Kolben mit 4 ml Kultur inokuliert. Die Induktion der P450-Expression in E. coli erfolgte nach Erreichen eines OD₅₇₈-Wertes zwischen 0,8 und 1,0 durch eine drei- bis vierstündige Hitzeschockinduktion bei 42°C.

15

20

d) Zellaufschluß

[0072] Zellpellets mit einer Biofeuchtmasse von bis zu 15 g E. coli DH5α wurden auf Eis aufgetaut und in 25 ml Kaliumphosphat-Puffer (50 mM, pH 7,5, 1 mM EDTA) oder Tris/HCl Puffer (50 mM, pH 7,5, 1 mM EDTA) suspendiert. Mittels dreiminütiger Ultraschallbehandlung (Branson Sonifier W250, (Dietzenbach, Deutschland), Leistungsabgabe 80 W, Arbeitsintervall 20%) wurde die auf Eis gekühlte E. coli-Zellsuspension aufgeschlossen. Vor der Proteinreinigung wurde die Zellsuspension für 20 min bei 32 500 g zentrifugiert und durch einen 0,22 mm Sterivex-GP-Filter (Millipore) filtriert, wobei man einen Rohextrakt erhält.

25

30

Beispiel 1

Klonierung und Expression von P450 aus *Thermus thermophilus* HB27 und den His-tag-Derivaten davon

1. Klonierung von P450 aus *Thermus thermophilus* HB27

35

[0073] Die kodierende P450-Sequenz (blunt ended) wurde in die HincII-Schnittstelle des Plasmids pTZ19R (MBI Fermentas) einkloniert.

[0074] Aus dem so erhaltenen Plasmid TTHB66 wurde die kodierende P450-Sequenz mit Hilfe der PCR amplifiziert. Dazu wurden folgende Primer verwendet:

40

a) 30-mer sense-Oligonucleotid, enthaltend die NdeI-Schnittstelle (kursiv gedruckt) als Teil des P450-ATG-Startcodons:

5'-CGAAGCT**CATATGA**AGCGCCTTTCCCTGAG (SEQ ID NO: 7).

45

b) 30-mer antisense-Oligonucleotid, enthaltend die EcoRI-Schnittstelle (kursiv gedruckt) als Teil des TGA-Stopcodons:

5'-GCG**GAATTC**ACGCCCGCACCTCCTCCCTAGG (SEQ ID NO: 8).

50

[0075] Das resultierende Fragment wurde in die NdeI-Schnittstellen des Vektors pCYTEXP1 (Plasmid mit dem temperaturinduzierbaren P_{RP}_L-Promotorsystem des Bakteriophagen λ (Belev T. N., et al., Plasmid (1991) 26: 147)) kloniert und in E. coli DH-5α (Clontech, Heidelberg) transformiert.

[0076] E. coli DH-5α, enthaltend das interessierende Plasmid wurde in LB-Medium in Gegenwart von Ampicillin inokuliert und die Kultur wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Ein Teil der Probe wurde in frisches LB-Medium (in Gegenwart von Ampicillin) inokuliert und die resultierende Kultur wurde bei 37°C bis zu OD = 0,9 kultiviert. Die Induktion erfolgte durch Erhöhung der Temperatur auf 42°C über einen Zeitraum von 24 Stunden. Die Veränderung des P450-Gehaltes während der Expression wurde anhand von Messungen des CO-Differenzspektrums bestimmt.

55

60

65

| Expressionszeit [h] | $\Delta A_{450-490}$ | P450 Konzentration [μ M] |
|------------------------|----------------------|----------------------------------|
| 4 | 0,092 | 0,056 |
| 8 | 0,176 | 0,106 |
| 24 | 0,106 | 0,064 |

2. Klonierung von P450 aus *Thermus thermophilus* HB27 mit N-terminalem His-tag

[0077] Die kodierende P450-Sequenz wurde durch PCR aus dem Plasmid TTHB66 unter Verwendung folgender Primer amplifiziert:

(a) 50-mer sense-Oligonucleotid, enthaltend die NdeI-Schnittstelle (kursiv gedruckt) als Teil des P450 ATG-Start-codons und die tag-codierenden Codons (unterstrichen):

5'-CGAAGCTCATATGCATCACCATCATCATCACAAAGCGCCTTTC (SEQ ID NO:9);

(b) 30-mer antisense-Oligonucleotid, enthaltend die EcoRI-Schnittstelle (kursiv gedruckt) als Teil des TGA-Stop-Codons:

5'-GCCGAATTCACGCCCCGCACCTCCTCCCTAGG (SEQ ID NO:8).

[0078] Das resultierende Fragment wurde in die NdeI- und EcoRI-Schnittstellen des Vektors p-CYTEXP1 kloniert und in *E. coli* DH-5 α exprimiert.

[0079] *E. coli* DH-5 α , enthaltend das interessierende Plasmid, wurde in LB-Medium in Gegenwart von Ampicillin inokuliert und die Kultur wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Ein Teil der Probe wurde in frisches LB-Medium (in Gegenwart von Ampicillin) inokuliert und die resultierende Kultur wurde bei 37°C bis zu OD = 0,9 kultiviert. Die Induktion erfolgte durch Erhöhung der Temperatur auf 42°C über einen Zeitraum von 24 Stunden. Die Veränderung des P450-Gehaltes während der Expression wurde anhand von Messungen des CO-Differenzspektrums bestimmt.

| Expressionszeit [h] | $\Delta A_{450-490}$ | P450 Konzentration [μ M] |
|------------------------|----------------------|----------------------------------|
| 4 | ND | ND |
| 8 | 0,097 | 0,073 |
| 24 | 0,111 | 0,073 |

3. Clonierung von P450 aus *Thermus thermophilus* HB27 mit C-terminalem His-tag

[0080] Die kodierende P450-Sequenz wurde durch PCR aus dem Plasmid TTHB66 unter Verwendung der folgenden Primer amplifiziert:

(a) 30-mer sense-Oligonucleotid, enthaltend die NdeI-Schnittstelle (kursiv gedruckt) als Teil des P450 ATG-Start-Codons:

5'-CGAAGCTCATATGAAGCGCCTTTCCTGAG (SEQ ID NO:7)

(b) 47-mer antisense-Oligonucleotid, enthaltend die EcoRI-Schnittstelle (kursiv gedruckt) als Teil des TGA-Stop-Codons sowie die unterstrichene tag-codierende Teilsequenz:

5'-CGGAATTCAGTGATGATGATGGTGATGCGCCCGCACCTCCTC (SEQ ID NO:10)

[0081] Das resultierende Fragment wurde in die NdeI- und EcoRI-Schnittstellen des Vektors p-CXTEXP1 cloniert und in *E. coli* DH-5 α exprimiert.

[0082] *E. coli* DH-5 α , enthaltend das interessierende Plasmid wurde in LB-Medium in Gegenwart von Ampicillin inokuliert und die Kultur wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Ein Teil der Probe wurde in frisches LB-Medium (in Gegenwart von Ampicillin) inokuliert und die resultierende Kultur wurde bei 37°C bis zu OD = 0,9 kultiviert. Die Induktion erfolgte durch Erhöhung der Temperatur auf 42°C über einen Zeitraum von 24 Stunden. Die Veränderung des P450-Gehal-

DE 100 51 175 A 1

tes während der Expression wurde anhand von Messungen des CO-Differenzspektrums bestimmt.

| Expressionszeit [h] | $\Delta A_{450-490}$ | P450 Konzentration [μM] |
|------------------------|----------------------|---|
| 4 | ND | ND |
| 8 | 0,1 | 0,075 |
| 24 | ND | ND |

Beispiel 2

Bestimmung der Thermostabilität von P450 aus *Thermus thermophilus* im Vergleich zu P450 BM3

[0083] Die beiden Enzyme wurden jeweils 30 Minuten in Tris/HCl-Puffer pH 7,5, 25 mM bei verschiedenen Temperaturen inkubiert. Die Ansätze wurden anschließend abgekühlt und die P450 Konzentration wurde spektrometrisch bestimmt. Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle zusammengefaßt und in Fig. 2 graphisch dargestellt.

| Temperatur [$^{\circ}\text{C}$] | | 30 | 40 | 50 | 60 |
|-----------------------------------|--------------|-----|----|----|----|
| P450 Konzentration [%] | P450 thermus | 100 | 89 | 29 | 22 |
| | P450 BM3 | 92 | 63 | 0 | 0 |

[0084] Wie man den Versuchsergebnissen entnimmt, besitzt das erfindungsgemäße Enzym nach 30-minütiger Inkubation bei allen Temperaturen eine signifikant höhere Temperaturstabilität.

DE 100 51 175 A 1

SEQUENZPROTOKOLL

<110> BASF Aktiengesellschaft

5 <120> Neue thermophile Cytochrom P450 Monooxygenasen

<130> M/41524

<140>

10 <141>

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.1

15 <210> 1

<211> 1170

<212> DNA

20 <213> Thermus thermophilus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1170)

25 <400> 1

| | |
|---|-----|
| atg aag cgc ctt tcc ctg agg gag gcc tgg ccc tac ctg aaa gac ctc | 48 |
| Met Lys Arg Leu Ser Leu Arg Glu Ala Trp Pro Tyr Leu Lys Asp Leu | |
| 1 5 10 15 | |
| cag caa gat ccc ctc gcc gtc ctg ctg gcg tgg ggc cgg gcc cac ccc | 96 |
| Gln Gln Asp Pro Leu Ala Val Leu Ala Trp Gly Arg Ala His Pro | |
| 20 25 30 | |
| cgg ctc ttc ctt ccc ctg ccc cgc ttc ccc ctg gcc ctg atc ttt gac | 144 |
| Arg Leu Phe Leu Pro Leu Pro Arg Phe Pro Leu Ala Leu Ile Phe Asp | |
| 35 40 45 | |
| ccc gag ggg gtg gag ggg gcg ctc ctc gcc gag ggg acc acc aag gcc | 192 |
| Pro Glu Gly Val Glu Gly Ala Leu Leu Ala Glu Gly Thr Thr Lys Ala | |
| 50 55 60 | |
| acc ttc cag tac cgg gcc ctc tcc cgc ctc acg ggg agg ggc ctc ctc | 240 |
| Thr Phe Gln Tyr Arg Ala Leu Ser Arg Leu Thr Gly Arg Gly Leu Leu | |
| 65 70 75 80 | |
| acc gac tgg ggg gaa agc tgg aag gag gcg cgc aag gcc ctc aaa gac | 288 |
| Thr Asp Trp Gly Glu Ser Trp Lys Glu Ala Arg Lys Ala Leu Lys Asp | |
| 85 90 95 | |
| ccc ttc ctg ccg aag aac gtc cgc ggc tac cgg gag gcc atg gag gag | 336 |
| Pro Phe Leu Pro Lys Asn Val Arg Gly Tyr Arg Glu Ala Met Glu Glu | |
| 100 105 110 | |
| gag gcc cgg gcc ttc ttc ggg gag tgg cgg ggg gag gag cgg gac ctg | 384 |
| Glu Ala Arg Ala Phe Phe Gly Glu Trp Arg Gly Glu Glu Arg Asp Leu | |
| 115 120 125 | |
| gac cac gag atg ctc gcc ctc tcc ctg cgc ctc ctc ggg cgg gcc ctc | 432 |
| Asp His Glu Met Leu Ala Leu Ser Leu Arg Leu Leu Gly Arg Ala Leu | |
| 130 135 140 | |
| ttc ggg aag ccc ctc tcc cca agc ctc gcg gag cac gcc ctt aag gcc | 480 |
| Phe Gly Lys Pro Leu Ser Pro Ser Leu Ala Glu His Ala Leu Lys Ala | |

DE 100 51 175 A 1

| 145 | 150 | 155 | 160 | | |
|---|-----|-----|-----|------|----|
| ctg gac cgg atc atg gcc cag acc agg agc ccc ctg gcc ctc ctg gac | | | | 528 | |
| Leu Asp Arg Ile Met Ala Gln Thr Arg Ser Pro Leu Ala Leu Leu Asp | | | | | 5 |
| 165 | | 170 | 175 | | |
| ctg gcc gcc gaa gcc cgc ttc cgg aag gac cgg ggg gcc ctc tac cgc | | | | 576 | |
| Leu Ala Ala Glu Ala Arg Phe Arg Lys Asp Arg Gly Ala Leu Tyr Arg | | | | | 10 |
| 180 | | 185 | 190 | | |
| gag gcg gaa gcc ctc atc gtc cac ccg ccc ctc tcc cac ctt ccc cga | | | | 624 | |
| Glu Ala Glu Ala Leu Ile Val His Pro Pro Leu Ser His Leu Pro Arg | | | | | 15 |
| 195 | | 200 | 205 | | |
| gag cgc gcc ctg agc gag gcc gtg acc ctc ctg gtg gcg ggc cac gag | | | | 672 | |
| Glu Arg Ala Leu Ser Glu Ala Val Thr Leu Leu Val Ala Gly His Glu | | | | | 20 |
| 210 | | 215 | 220 | | |
| acg gtg gcg agc gcc ctc acc tgg tcc ttt ctc ctc ctc tcc cac cgc | | | | 720 | |
| Thr Val Ala Ser Ala Leu Thr Trp Ser Phe Leu Leu Leu Ser His Arg | | | | | 25 |
| 225 | | 230 | 235 | 240 | |
| ccg gac tgg cag aag cgg gtg gcc gag agc gag gag gcg gcc ctc gcc | | | | 768 | |
| Pro Asp Trp Gln Lys Arg Val Ala Glu Ser Glu Glu Ala Ala Leu Ala | | | | | 30 |
| 245 | | 250 | 255 | | |
| gcc ttc cag gag gcc ctg agg ctc tac ccc ccc gcc tgg atc ctc acc | | | | 816 | |
| Ala Phe Gln Glu Ala Leu Arg Leu Tyr Pro Pro Ala Trp Ile Leu Thr | | | | | 35 |
| 260 | | 265 | 270 | | |
| cgg agg ctg gaa agg ccc ctc ctc ctg gga gag gac cgg ctc ccc ccg | | | | 864 | |
| Arg Arg Leu Glu Arg Pro Leu Leu Leu Gly Glu Asp Arg Leu Pro Pro | | | | | 40 |
| 275 | | 280 | 285 | | |
| ggc acc acc ctg gtc ctc tcc ccc tac gtg acc cag agg ctc cac ttc | | | | 912 | |
| Gly Thr Thr Leu Val Leu Ser Pro Tyr Val Thr Gln Arg Leu His Phe | | | | | 45 |
| 290 | | 295 | 300 | | |
| ccc gat ggg gag gcc ttc cgg ccc gag cgc ttc ctg gag gaa agg ggg | | | | 960 | |
| Pro Asp Gly Glu Ala Phe Arg Pro Glu Arg Phe Leu Glu Glu Arg Gly | | | | | 50 |
| 305 | | 310 | 315 | 320 | |
| acc cct tcg ggg cgc tac ttc ccc ttt ggc ctg ggg cag agg ctc tgc | | | | 1008 | |
| Thr Pro Ser Gly Arg Tyr Phe Pro Phe Gly Leu Gly Gln Arg Leu Cys | | | | | 55 |
| 325 | | 330 | 335 | | |
| ctg ggg cgg gac ttc gcc ctc ctc gag ggc ccc atc gtc ctc agg gcc | | | | 1056 | |
| Leu Gly Arg Asp Phe Ala Leu Leu Glu Gly Pro Ile Val Leu Arg Ala | | | | | 60 |
| 340 | | 345 | 350 | | |
| ttc ttc cgc cgc ttc cgc cta gac ccc ctc ccc ttc ccc cgg gtc ctc | | | | 1104 | |
| Phe Phe Arg Arg Phe Arg Leu Asp Pro Leu Pro Phe Pro Arg Val Leu | | | | | 65 |
| 355 | | 360 | 365 | | |
| gcc cag gtc acc ctg agg ccc gaa ggc ggg ctt ccc gcg cgg cct agg | | | | 1152 | |
| Ala Gln Val Thr Leu Arg Pro Glu Gly Gly Leu Pro Ala Arg Pro Arg | | | | | |
| 370 | | 375 | 380 | | |
| gag gag gtg cgg gcg tga | | | | 1170 | |
| Glu Glu Val Arg Ala | | | | | |
| 385 | | 390 | | | |

DE 100 51 175 A 1

<210> 2
 <211> 389
 5 <212> PRT
 <213> Thermus thermophilus

 <400> 2
 10 Met Lys Arg Leu Ser Leu Arg Glu Ala Trp Pro Tyr Leu Lys Asp Leu
 1 5 10 15

 Gln Gln Asp Pro Leu Ala Val Leu Leu Ala Trp Gly Arg Ala His Pro
 20 25 30
 15
 Arg Leu Phe Leu Pro Leu Pro Arg Phe Pro Leu Ala Leu Ile Phe Asp
 35 40 45

 20 Pro Glu Gly Val Glu Gly Ala Leu Leu Ala Glu Gly Thr Thr Lys Ala
 50 55 60

 Thr Phe Gln Tyr Arg Ala Leu Ser Arg Leu Thr Gly Arg Gly Leu Leu
 65 70 75 80
 25
 Thr Asp Trp Gly Glu Ser Trp Lys Glu Ala Arg Lys Ala Leu Lys Asp
 85 90 95

 30 Pro Phe Leu Pro Lys Asn Val Arg Gly Tyr Arg Glu Ala Met Glu Glu
 100 105 110

 Glu Ala Arg Ala Phe Phe Gly Glu Trp Arg Gly Glu Glu Arg Asp Leu
 115 120 125
 35
 Asp His Glu Met Leu Ala Leu Ser Leu Arg Leu Leu Gly Arg Ala Leu
 130 135 140

 Phe Gly Lys Pro Leu Ser Pro Ser Leu Ala Glu His Ala Leu Lys Ala
 40 145 150 155 160

 Leu Asp Arg Ile Met Ala Gln Thr Arg Ser Pro Leu Ala Leu Leu Asp
 165 170 175
 45
 Leu Ala Ala Glu Ala Arg Phe Arg Lys Asp Arg Gly Ala Leu Tyr Arg
 180 185 190

 Glu Ala Glu Ala Leu Ile Val His Pro Pro Leu Ser His Leu Pro Arg
 50 195 200 205

 Glu Arg Ala Leu Ser Glu Ala Val Thr Leu Leu Val Ala Gly His Glu
 210 215 220
 55
 Thr Val Ala Ser Ala Leu Thr Trp Ser Phe Leu Leu Leu Ser His Arg
 225 230 235 240

 Pro Asp Trp Gln Lys Arg Val Ala Glu Ser Glu Glu Ala Ala Leu Ala
 245 250 255
 60
 Ala Phe Gln Glu Ala Leu Arg Leu Tyr Pro Pro Ala Trp Ile Leu Thr
 260 265 270

 Arg Arg Leu Glu Arg Pro Leu Leu Leu Gly Glu Asp Arg Leu Pro Pro
 65 275 280 285

 Gly Thr Thr Leu Val Leu Ser Pro Tyr Val Thr Gln Arg Leu His Phe
 290 295 300

DE 100 51 175 A 1

| | | |
|---|-----|-----|
| Pro Asp Gly Glu Ala Phe Arg Pro Glu Arg Phe Leu Glu Glu Arg Gly | | |
| 305 | 310 | 320 |
| Thr Pro Ser Gly Arg Tyr Phe Pro Phe Gly Leu Gly Gln Arg Leu Cys | | 5 |
| 325 | 330 | 335 |
| Leu Gly Arg Asp Phe Ala Leu Leu Glu Gly Pro Ile Val Leu Arg Ala | | 10 |
| 340 | 345 | 350 |
| Phe Phe Arg Arg Phe Arg Leu Asp Pro Leu Pro Phe Pro Arg Val Leu | | |
| 355 | 360 | 365 |
| Ala Gln Val Thr Leu Arg Pro Glu Gly Gly Leu Pro Ala Arg Pro Arg | | 15 |
| 370 | 375 | 380 |
| Glu Glu Val Arg Ala | | 20 |
| 385 | | |
| | | |
| <210> 3 | | |
| <211> 1188 | | 25 |
| <212> DNA | | |
| <213> Künstliche Sequenz | | |
| | | |
| <220> | | |
| <221> misc_feature | | 30 |
| <222> (4)..(21) | | |
| <223> His tag | | |
| | | |
| <220> | | |
| <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:N-terminal | | 35 |
| his tagged | | |
| | | |
| <220> | | |
| <221> CDS | | 40 |
| <222> (1)..(1188) | | |
| | | |
| <400> 3 | | |
| atg cat cac cat cat cat cac aag cgc ctt tcc ctg agg gag gcc tgg | 48 | |
| Met His His His His His His Lys Arg Leu Ser Leu Arg Glu Ala Trp | | 45 |
| 1 5 10 15 | | |
| ccc tac ctg aaa gac ctc cag caa gat ccc ctc gcc gtc ctg ctg gcg | 96 | |
| Pro Tyr Leu Lys Asp Leu Gln Gln Asp Pro Leu Ala Val Leu Leu Ala | | 50 |
| 20 25 30 | | |
| tgg ggc cgg gcc cac ccc cgg ctc ttc ctt ccc ctg ccc cgc ttc ccc | 144 | |
| Trp Gly Arg Ala His Pro Arg Leu Phe Leu Pro Leu Pro Arg Phe Pro | | 55 |
| 35 40 45 | | |
| ctg gcc ctg atc ttt gac ccc gag ggg gtg gag ggg gcg ctc ctc gcc | 192 | |
| Leu Ala Leu Ile Phe Asp Pro Glu Gly Val Glu Gly Ala Leu Leu Ala | | |
| 50 55 60 | | |
| gag ggg acc acc aag gcc acc ttc cag tac cgg gcc ctc tcc cgc ctc | 240 | 60 |
| Glu Gly Thr Thr Lys Ala Thr Phe Gln Tyr Arg Ala Leu Ser Arg Leu | | |
| 65 70 75 80 | | |
| acg ggg agg ggc ctc ctc acc gac tgg ggg gaa agc tgg aag gag gcg | 288 | 65 |
| Thr Gly Arg Gly Leu Leu Thr Asp Trp Gly Glu Ser Trp Lys Glu Ala | | |
| 85 90 95 | | |

DE 100 51 175 A 1

| | | |
|----|---|------|
| | cgc aag gcc ctc aaa gac ccc ttc ctg ccg aag aac gtc cgc ggc tac | 336 |
| | Arg Lys Ala Leu Lys Asp Pro Phe Leu Pro Lys Asn Val Arg Gly Tyr | |
| | 100 105 110 | |
| 5 | cgg gag gcc atg gag gag gag gcc cgg gcc ttc ttc ggg gag tgg cgg | 384 |
| | Arg Glu Ala Met Glu Glu Glu Ala Arg Ala Phe Phe Gly Glu Trp Arg | |
| | 115 120 125 | |
| 10 | ggg gag gag cgg gac ctg gac cac gag atg ctc gcc ctc tcc ctg cgc | 432 |
| | Gly Glu Glu Arg Asp Leu Asp His Glu Met Leu Ala Leu Ser Leu Arg | |
| | 130 135 140 | |
| 15 | ctc ctc ggg cgg gcc ctc ttc ggg aag ccc ctc tcc cca agc ctc gcg | 480 |
| | Leu Leu Gly Arg Ala Leu Phe Gly Lys Pro Leu Ser Pro Ser Leu Ala | |
| | 145 150 155 160 | |
| 20 | gag cac gcc ctt aag gcc ctg gac cgg atc atg gcc cag acc agg agc | 528 |
| | Glu His Ala Leu Lys Ala Leu Asp Arg Ile Met Ala Gln Thr Arg Ser | |
| | 165 170 175 | |
| 25 | ccc ctg gcc ctc ctg gac ctg gcc gcc gaa gcc cgc ttc cgg aag gac | 576 |
| | Pro Leu Ala Leu Leu Asp Leu Ala Ala Glu Ala Arg Phe Arg Lys Asp | |
| | 180 185 190 | |
| 30 | cgg ggg gcc ctc tac cgc gag gcg gaa gcc ctc atc gtc cac ccg ccc | 624 |
| | Arg Gly Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Glu Ala Leu Ile Val His Pro Pro | |
| | 195 200 205 | |
| 35 | ctc tcc cac ctt ccc cga gag cgc gcc ctg agc gag gcc gtg acc ctc | 672 |
| | Leu Ser His Leu Pro Arg Glu Arg Ala Leu Ser Glu Ala Val Thr Leu | |
| | 210 215 220 | |
| 40 | ctg gtg gcg ggc cac gag acg gtg gcg agc gcc ctc acc tgg tcc ttt | 720 |
| | Leu Val Ala Gly His Glu Thr Val Ala Ser Ala Leu Thr Trp Ser Phe | |
| | 225 230 235 240 | |
| 45 | ctc ctc ctc tcc cac cgc ccg gac tgg cag aag cgg gtg gcc gag agc | 768 |
| | Leu Leu Leu Ser His Arg Pro Asp Trp Gln Lys Arg Val Ala Glu Ser | |
| | 245 250 255 | |
| 50 | gag gag gcg gcc ctc gcc gcc ttc cag gag gcc ctg agg ctc tac ccc | 816 |
| | Glu Glu Ala Ala Leu Ala Ala Phe Gln Glu Ala Leu Arg Leu Tyr Pro | |
| | 260 265 270 | |
| 55 | ccc gcc tgg atc ctc acc cgg agg ctg gaa agg ccc ctc ctc ctg gga | 864 |
| | Pro Ala Trp Ile Leu Thr Arg Arg Leu Glu Arg Pro Leu Leu Leu Gly | |
| | 275 280 285 | |
| 60 | gag gac cgg ctc ccc ccg ggc acc acc ctg gtc ctc tcc ccc tac gtg | 912 |
| | Glu Asp Arg Leu Pro Pro Gly Thr Thr Leu Val Leu Ser Pro Tyr Val | |
| | 290 295 300 | |
| 65 | acc cag agg ctc cac ttc ccc gat ggg gag gcc ttc cgg ccc gag cgc | 960 |
| | Thr Gln Arg Leu His Phe Pro Asp Gly Glu Ala Phe Arg Pro Glu Arg | |
| | 305 310 315 320 | |
| 70 | ttc ctg gag gaa agg ggg acc cct tgg ggg cgc tac ttc ccc ttt ggc | 1008 |
| | Phe Leu Glu Glu Arg Gly Thr Pro Ser Gly Arg Tyr Phe Pro Phe Gly | |
| | 325 330 335 | |
| 75 | ctg ggg cag agg ctc tgc ctg ggg cgg gac ttc gcc ctc ctc gag ggc | 1056 |
| | Leu Gly Gln Arg Leu Cys Leu Gly Arg Asp Phe Ala Leu Leu Glu Gly | |
| | 340 345 350 | |

DE 100 51 175 A 1

ccc atc gtc ctc agg gcc ttc ttc cgc cgc ttc cgc cta gac ccc ctc 1104
 Pro Ile Val Leu Arg Ala Phe Phe Arg Arg Phe Arg Leu Asp Pro Leu
 355 360 365

ccc ttc ccc cgg gtc ctc gcc cag gtc acc ctg agg ccc gaa ggc ggg 1152
 Pro Phe Pro Arg Val Leu Ala Gln Val Thr Leu Arg Pro Glu Gly Gly
 370 375 380

ctt ccc gcg cgg cct agg gag gag gtg cgg gcg tga 1188
 Leu Pro Ala Arg Pro Arg Glu Glu Val Arg Ala
 385 390 395

<210> 4
 <211> 395
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:N-terminal
 his tagged

<400> 4
 Met His His His His His His Lys Arg Leu Ser Leu Arg Glu Ala Trp
 1 5 10 15

Pro Tyr Leu Lys Asp Leu Gln Gln Asp Pro Leu Ala Val Leu Leu Ala
 20 25 30

Trp Gly Arg Ala His Pro Arg Leu Phe Leu Pro Leu Pro Arg Phe Pro
 35 40 45

Leu Ala Leu Ile Phe Asp Pro Glu Gly Val Glu Gly Ala Leu Leu Ala
 50 55 60

Glu Gly Thr Thr Lys Ala Thr Phe Gln Tyr Arg Ala Leu Ser Arg Leu
 65 70 75 80

Thr Gly Arg Gly Leu Leu Thr Asp Trp Gly Glu Ser Trp Lys Glu Ala
 85 90 95

Arg Lys Ala Leu Lys Asp Pro Phe Leu Pro Lys Asn Val Arg Gly Tyr
 100 105 110

Arg Glu Ala Met Glu Glu Glu Ala Arg Ala Phe Phe Gly Glu Trp Arg
 115 120 125

Gly Glu Glu Arg Asp Leu Asp His Glu Met Leu Ala Leu Ser Leu Arg
 130 135 140

Leu Leu Gly Arg Ala Leu Phe Gly Lys Pro Leu Ser Pro Ser Leu Ala
 145 150 155 160

Glu His Ala Leu Lys Ala Leu Asp Arg Ile Met Ala Gln Thr Arg Ser
 165 170 175

Pro Leu Ala Leu Leu Asp Leu Ala Ala Glu Ala Arg Phe Arg Lys Asp
 180 185 190

Arg Gly Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Glu Ala Leu Ile Val His Pro Pro
 195 200 205

Leu Ser His Leu Pro Arg Glu Arg Ala Leu Ser Glu Ala Val Thr Leu
 210 215 220

DE 100 51 175 A 1

Leu Val Ala Gly His Glu Thr Val Ala Ser Ala Leu Thr Trp Ser Phe
 225 230 235 240
 5 Leu Leu Leu Ser His Arg Pro Asp Trp Gln Lys Arg Val Ala Glu Ser
 245 250 255
 Glu Glu Ala Ala Leu Ala Ala Phe Gln Glu Ala Leu Arg Leu Tyr Pro
 260 265 270
 10 Pro Ala Trp Ile Leu Thr Arg Arg Leu Glu Arg Pro Leu Leu Leu Gly
 275 280 285
 15 Glu Asp Arg Leu Pro Pro Gly Thr Thr Leu Val Leu Ser Pro Tyr Val
 290 295 300
 Thr Gln Arg Leu His Phe Pro Asp Gly Glu Ala Phe Arg Pro Glu Arg
 305 310 315 320
 20 Phe Leu Glu Glu Arg Gly Thr Pro Ser Gly Arg Tyr Phe Pro Phe Gly
 325 330 335
 Leu Gly Gln Arg Leu Cys Leu Gly Arg Asp Phe Ala Leu Leu Glu Gly
 25 340 345 350
 Pro Ile Val Leu Arg Ala Phe Phe Arg Arg Phe Arg Leu Asp Pro Leu
 355 360 365
 30 Pro Phe Pro Arg Val Leu Ala Gln Val Thr Leu Arg Pro Glu Gly Gly
 370 375 380
 Leu Pro Ala Arg Pro Arg Glu Glu Val Arg Ala
 35 385 390 395

 <210> 5
 40 <211> 1188
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 45 <221> misc_feature
 <222> (1168)..(1185)
 <223> His tag

 <220>
 50 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:C-terminal
 His-tagged

 <220>
 55 <221> CDS
 <222> (1)..(1188)

 <400> 5
 60 atg aag cgc ctt tcc ctg agg gag gcc tgg ccc tac ctg aaa gac ctc 48
 Met Lys Arg Leu Ser Leu Arg Glu Ala Trp Pro Tyr Leu Lys Asp Leu
 1 5 10 15
 cag caa gat ccc ctc gcc gtc ctg ctg gcg tgg ggc cgg gcc cac ccc 96
 65 Gln Gln Asp Pro Leu Ala Val Leu Leu Ala Trp Gly Arg Ala His Pro
 20 25 30

DE 100 51 175 A 1

| | | |
|---|-----|----|
| cgg ctc ttc ctt ccc ctg ccc cgc ttc ccc ctg gcc ctg atc ttt gac Arg Leu Phe Leu Pro Leu Pro Arg Phe Pro Leu Ala Leu Ile Phe Asp 35 40 45 | 144 | |
| ccc gag ggg gtg gag ggg gcg ctc ctc gcc gag ggg acc acc aag gcc Pro Glu Gly Val Glu Gly Ala Leu Leu Ala Glu Gly Thr Thr Lys Ala 50 55 60 | 192 | 5 |
| acc ttc cag tac cgg gcc ctc tcc cgc ctc acg ggg agg ggc ctc ctc Thr Phe Gln Tyr Arg Ala Leu Ser Arg Leu Thr Gly Arg Gly Leu Leu 65 70 75 80 | 240 | 10 |
| acc gac tgg ggg gaa agc tgg aag gag gcg cgc aag gcc ctc aaa gac Thr Asp Trp Gly Glu Ser Trp Lys Glu Ala Arg Lys Ala Leu Lys Asp 85 90 95 | 288 | 15 |
| ccc ttc ctg ccg aag aac gtc cgc ggc tac cgg gag gcc atg gag gag Pro Phe Leu Pro Lys Asn Val Arg Gly Tyr Arg Glu Ala Met Glu Glu 100 105 110 | 336 | 20 |
| gag gcc cgg gcc ttc ttc ggg gag tgg cgg ggg gag gag cgg gac ctg Glu Ala Arg Ala Phe Phe Gly Glu Trp Arg Gly Glu Glu Arg Asp Leu 115 120 125 | 384 | 25 |
| gac cac gag atg ctc gcc ctc tcc ctg cgc ctc ctc ggg cgg gcc ctc Asp His Glu Met Leu Ala Leu Ser Leu Arg Leu Leu Gly Arg Ala Leu 130 135 140 | 432 | 30 |
| ttc ggg aag ccc ctc tcc cca agc ctc gcg gag cac gcc ctt aag gcc Phe Gly Lys Pro Leu Ser Pro Ser Leu Ala Glu His Ala Leu Lys Ala 145 150 155 160 | 480 | 35 |
| ctg gac cgg atc atg gcc cag acc agg agc ccc ctg gcc ctc ctg gac Leu Asp Arg Ile Met Ala Gln Thr Arg Ser Pro Leu Ala Leu Leu Asp 165 170 175 | 528 | |
| ctg gcc gcc gaa gcc cgc ttc cgg aag gac cgg ggg gcc ctc tac cgc Leu Ala Ala Glu Ala Arg Phe Arg Lys Asp Arg Gly Ala Leu Tyr Arg 180 185 190 | 576 | 40 |
| gag gcg gaa gcc ctc atc gtc cac ccg ccc ctc tcc cac ctt ccc cga Glu Ala Glu Ala Leu Ile Val His Pro Pro Leu Ser His Leu Pro Arg 195 200 205 | 624 | 45 |
| gag cgc gcc ctg agc gag gcc gtg acc ctc ctg gtg gcg ggc cac gag Glu Arg Ala Leu Ser Glu Ala Val Thr Leu Leu Val Ala Gly His Glu 210 215 220 | 672 | 50 |
| acg gtg gcg agc gcc ctc acc tgg tcc ttt ctc ctc ctc tcc cac cgc Thr Val Ala Ser Ala Leu Thr Trp Ser Phe Leu Leu Leu Ser His Arg 225 230 235 240 | 720 | 55 |
| ccg gac tgg cag aag cgg gtg gcc gag agc gag gag gcg gcc ctc gcc Pro Asp Trp Gln Lys Arg Val Ala Glu Ser Glu Glu Ala Ala Leu Ala 245 250 255 | 768 | 60 |
| gcc ttc cag gag gcc ctg agg ctc tac ccc ccc gcc tgg atc ctc acc Ala Phe Gln Glu Ala Leu Arg Leu Tyr Pro Pro Ala Trp Ile Leu Thr 260 265 270 | 816 | |
| cgg agg ctg gaa agg ccc ctc ctc ctg gga gag gac cgg ctc ccc ccg Arg Arg Leu Glu Arg Pro Leu Leu Gly Glu Asp Arg Leu Pro Pro 275 280 285 | 864 | 65 |

DE 100 51 175 A 1

ggc acc acc ctg gtc ctc tcc ccc tac gtg acc cag agg ctc cac ttc 912
 Gly Thr Thr Leu Val Leu Ser Pro Tyr Val Thr Gln Arg Leu His Phe
 290 295 300

5 ccc gat ggg gag gcc ttc cgg ccc gag cgc ttc ctg gag gaa agg ggg 960
 Pro Asp Gly Glu Ala Phe Arg Pro Glu Arg Phe Leu Glu Glu Arg Gly
 305 310 315 320

10 acc cct tcg ggg cgc tac ttc ccc ttt ggc ctg ggg cag agg ctc tgc 1008
 Thr Pro Ser Gly Arg Tyr Phe Pro Phe Gly Leu Gly Gln Arg Leu Cys
 325 330 335

15 ctg ggg cgg gac ttc gcc ctc ctc gag ggc ccc atc gtc ctc agg gcc 1056
 Leu Gly Arg Asp Phe Ala Leu Leu Glu Gly Pro Ile Val Leu Arg Ala
 340 345 350

20 ttc ttc cgc cgc ttc cgc cta gac ccc ctc ccc ttc ccc cgg gtc ctc 1104
 Phe Phe Arg Arg Phe Arg Leu Asp Pro Leu Pro Phe Pro Arg Val Leu
 355 360 365

25 gcc cag gtc acc ctg agg ccc gaa ggc ggg ctt ccc gcg cgg cct agg 1152
 Ala Gln Val Thr Leu Arg Pro Glu Gly Gly Leu Pro Ala Arg Pro Arg
 370 375 380

30 gag gag gtg cgg gcg cat cac cat cat cat cac tga 1188
 Glu Glu Val Arg Ala His His His His His His
 385 390 395

35 <210> 6
 <211> 395
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:C-terminal
 His-tagged

40 <400> 6
 Met Lys Arg Leu Ser Leu Arg Glu Ala Trp Pro Tyr Leu Lys Asp Leu
 1 5 10 15

45 Gln Gln Asp Pro Leu Ala Val Leu Leu Ala Trp Gly Arg Ala His Pro
 20 25 30

Arg Leu Phe Leu Pro Leu Pro Arg Phe Pro Leu Ala Leu Ile Phe Asp
 35 40 45

50 Pro Glu Gly Val Glu Gly Ala Leu Leu Ala Glu Gly Thr Thr Lys Ala
 50 55 60

55 Thr Phe Gln Tyr Arg Ala Leu Ser Arg Leu Thr Gly Arg Gly Leu Leu
 65 70 75 80

Thr Asp Trp Gly Glu Ser Trp Lys Glu Ala Arg Lys Ala Leu Lys Asp
 85 90 95

60 Pro Phe Leu Pro Lys Asn Val Arg Gly Tyr Arg Glu Ala Met Glu Glu
 100 105 110

65 Glu Ala Arg Ala Phe Phe Gly Glu Trp Arg Gly Glu Glu Arg Asp Leu
 115 120 125

Asp His Glu Met Leu Ala Leu Ser Leu Arg Leu Leu Gly Arg Ala Leu

DE 100 51 175 A 1

| | | | |
|---|---|-----|-----|
| 130 | 135 | 140 | |
| Phe Gly Lys Pro Leu Ser | Pro Ser Leu Ala Glu His Ala Leu Lys Ala | | |
| 145 | 150 | 155 | 160 |
| | | | 5 |
| Leu Asp Arg Ile Met Ala Gln Thr Arg Ser Pro Leu Ala Leu Leu Asp | | | |
| | 165 | 170 | 175 |
| | | | 10 |
| Leu Ala Ala Glu Ala Arg Phe Arg Lys Asp Arg Gly Ala Leu Tyr Arg | | | |
| | 180 | 185 | 190 |
| | | | |
| Glu Ala Glu Ala Leu Ile Val His Pro Pro Leu Ser His Leu Pro Arg | | | |
| | 195 | 200 | 205 |
| | | | 15 |
| Glu Arg Ala Leu Ser Glu Ala Val Thr Leu Leu Val Ala Gly His Glu | | | |
| | 210 | 215 | 220 |
| | | | |
| Thr Val Ala Ser Ala Leu Thr Trp Ser Phe Leu Leu Leu Ser His Arg | | | |
| | 225 | 230 | 235 |
| | | | 20 |
| Pro Asp Trp Gln Lys Arg Val Ala Glu Ser Glu Glu Ala Ala Leu Ala | | | |
| | 245 | 250 | 255 |
| | | | 25 |
| Ala Phe Gln Glu Ala Leu Arg Leu Tyr Pro Pro Ala Trp Ile Leu Thr | | | |
| | 260 | 265 | 270 |
| | | | |
| Arg Arg Leu Glu Arg Pro Leu Leu Leu Gly Glu Asp Arg Leu Pro Pro | | | |
| | 275 | 280 | 285 |
| | | | 30 |
| Gly Thr Thr Leu Val Leu Ser Pro Tyr Val Thr Gln Arg Leu His Phe | | | |
| | 290 | 295 | 300 |
| | | | 35 |
| Pro Asp Gly Glu Ala Phe Arg Pro Glu Arg Phe Leu Glu Glu Arg Gly | | | |
| | 305 | 310 | 315 |
| | | | 320 |
| Thr Pro Ser Gly Arg Tyr Phe Pro Phe Gly Leu Gly Gln Arg Leu Cys | | | |
| | 325 | 330 | 335 |
| | | | 40 |
| Leu Gly Arg Asp Phe Ala Leu Leu Glu Gly Pro Ile Val Leu Arg Ala | | | |
| | 340 | 345 | 350 |
| | | | |
| Phe Phe Arg Arg Phe Arg Leu Asp Pro Leu Pro Phe Pro Arg Val Leu | | | |
| | 355 | 360 | 365 |
| | | | 45 |
| Ala Gln Val Thr Leu Arg Pro Glu Gly Gly Leu Pro Ala Arg Pro Arg | | | |
| | 370 | 375 | 380 |
| | | | 50 |
| Glu Glu Val Arg Ala His His His His His His | | | |
| | 385 | 390 | 395 |
| | | | 55 |
| <210> 7 | | | |
| <211> 30 | | | |
| <212> DNA | | | |
| <213> Künstliche Sequenz | | | |
| | | | 60 |
| <220> | | | |
| <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:PCR-Primer | | | |
| | | | 65 |
| <400> 7 | | | |
| cgaagctcat atgaagcgcc tttccctgag | | | |
| | | | 30 |

<210> 8
 <211> 30
 <212> DNA
 5 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:PCR-Primer

 10 <400> 8
 gcgaattcac gccgcacact cctccctagg 30

 15 <210> 9
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

 20 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:PCR-Primer

 <400> 9
 cgaagctcat atgcatcacc atcatcatca caagcgctt tc 42
 25

 <210> 10
 <211> 42
 <212> DNA
 30 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:PCR-Primer

 35 <400> 10
 cggaattcag tgatgatgat ggtgatgcgc ccgcacctcc tc 42

40 Patentansprüche

1. Cytochrom P450 Monooxygenase, **dadurch gekennzeichnet**, dass sie eine Aminosäuresequenz aufweist, welche eine Teilsequenz von Aminosäurerest Pro328 bis Glu345 gemäß SEQ ID NO: 2 umfasst.
2. Cytochrom P450 Monooxygenase nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Aminosäuresequenz aufweist, welche außerdem eine Teilsequenz von Aminosäurerest Val216 bis Ala227 gemäß SEQ ID NO: 2 umfasst.
3. Cytochrom P450 Monooxygenase nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Aminosäuresequenz aufweist, welche wenigstens eine weitere Teilsequenz umfasst, die ausgewählt ist unter einer Teilsequenzen von wenigstens 10 aufeinanderfolgenden Aminosäuren aus den durch die Aminosäurereste Met1 bis Phe327 und Gly346 bis Ala389 gemäß SEQ ID NO: 2 vorgegebenen Sequenzbereichen.
4. Cytochrom P450 Monooxygenase nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Aminosäuresequenz aufweist, welche im wesentlichen SEQ ID NO: 2 entspricht.
5. Cytochrom P450 Monooxygenase nach einem der vorhergehenden Ansprüche aus Bakterien der Gattung *Thermus* sp..
6. Cytochrom P450 Monooxygenase nach Anspruch 5, aus einer Bakterium der Spezies *Thermus thermophilus*.
7. Oligonukleotid, welches mit einer Nukleinsäuresequenz hybridisiert, die für eine Cytochrom P450 Monooxygenase nach einem der vorhergehenden Ansprüche kodiert.
8. Oligonukleotid nach Anspruch 7, welches eine Nukleinsäuresequenz umfasst, die im wesentlichen komplementär ist zu einem wenigstens 45 aufeinanderfolgende Nukleotidreste umfassenden Nukleotidsequenzbereich gemäß SEQ ID NO: 1.
9. Polynukleotid, welches mit einem Oligonukleotid nach Anspruch 7 oder 8 hybridisiert und für eine Cytochrom P450 Monooxygenase kodiert.
10. Polynukleotid, das für eine Cytochrom P450 Monooxygenase gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 kodiert, sowie dazu komplementäre Polynukleotide.
11. Polynukleotid nach Anspruch 10 mit einer Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 1, sowie die dazu komplementäre Nukleinsäuresequenz.
12. Expressionskassette, umfassend wenigstens eine regulatorische Nukleinsäuresequenz operativ verknüpft mit einem Polynukleotid gemäß einem der Ansprüche 9 bis 11.
13. Rekombinanter Vektor, der ein Polynukleotid gemäß einem der Ansprüche 9 bis 11 oder eine Expressionskassette

sette gemäß Anspruch 12 trägt.

14. Mikroorganismus, enthaltend wenigstens einen rekombinanten Vektor gemäß Anspruch 13.

15. Verfahren zur Herstellung einer Cytochrom P450 Monooxygenase gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei man einen Mikroorganismus, welcher Cytochrom P450 Monooxygenase produziert, kultiviert und die Monooxygenase aus der Kultur isoliert.

16. Verfahren zur mikrobiologischen Oxidation einer organischen Verbindung, wobei man diese Verbindung mit wenigstens einer Cytochrom P450 Monooxygenase nach einem der Ansprüche 1 bis 6 umsetzt.

17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß man

a1) einen rekombinanten Mikroorganismus nach Anspruch 14 in einem Kulturmedium, in Gegenwart der exogenen oder intermediär gebildeten organischen Verbindung, welche ein Substrat der Monooxygenase ist, kultiviert; oder

a2) ein Substrat-haltiges Reaktionsmedium mit einer Cytochrom P450 Monooxygenase nach einem der Ansprüche 1 bis 6 inkubiert; und

b) das gebildete Oxidationsprodukt oder ein Folgeprodukt davon aus dem Medium isoliert.

18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass das exogene oder intermediär gebildete Substrat ausgewählt ist unter

a) gegebenenfalls substituierten N-, O- oder S-heterocyclischen ein-, zwei- oder mehrkernigen aromatischen Verbindungen;

b) gegebenenfalls substituierten ein- oder mehrkernigen Aromaten;

c) geradkettigen oder verzweigten Alkanen und Alkenen;

d) gegebenenfalls substituierten Cycloalkanen und Cycloalkenen; und

e) aliphatischen (terminal gesättigten) Carbonsäuren.

19. Verfahren nach Anspruch 17 oder 18, dadurch gekennzeichnet, daß man die Oxidation durch Kultivierung der Mikroorganismen in Gegenwart von Sauerstoff bei einer Kultivierungstemperatur von mindestens etwa 20 und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9 durchführt.

20. Verfahren nach Anspruch 17 oder 18, dadurch gekennzeichnet, daß man als exogenes Substrat wenigstens eine Verbindung, ausgewählt unter den oben definierten Gruppen a) bis e), einem Medium zusetzt und die Oxidation durch enzymatische Umsetzung des substrathaltigen Mediums in Gegenwart von Sauerstoff bei einer Temperatur von mindestens etwa 20°C und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9 durchführt, wobei das substrathaltige Medium außerdem bezogen auf das Substrat einen etwa 10- bis 100-fachen molaren Überschuß an Reduktionsäquivalenten enthält.

21. Bioreaktor, umfassend ein Enzym nach einem der Ansprüche 1 bis 6 oder einen rekombinanten Mikroorganismus nach Anspruch 14 in immobilisierter Form.

22. Verwendung einer Cytochrom P450 Monooxygenase nach einem der Ansprüche 1 bis 6, eines Vektors nach Anspruch 13, oder eines Mikroorganismus 14 zur mikrobiologischen Oxidation von

a) gegebenenfalls substituierten N-, O- oder S-heterocyclischen ein-, zwei- oder mehrkernigen aromatischen Verbindungen;

b) gegebenenfalls substituierten ein- oder mehrkernigen Aromaten;

c) geradkettigen oder verzweigten Alkanen und Alkenen;

d) gegebenenfalls substituierten Cycloalkanen und Cycloalkenen/und oder

e) aliphatischen Carbonsäuren.

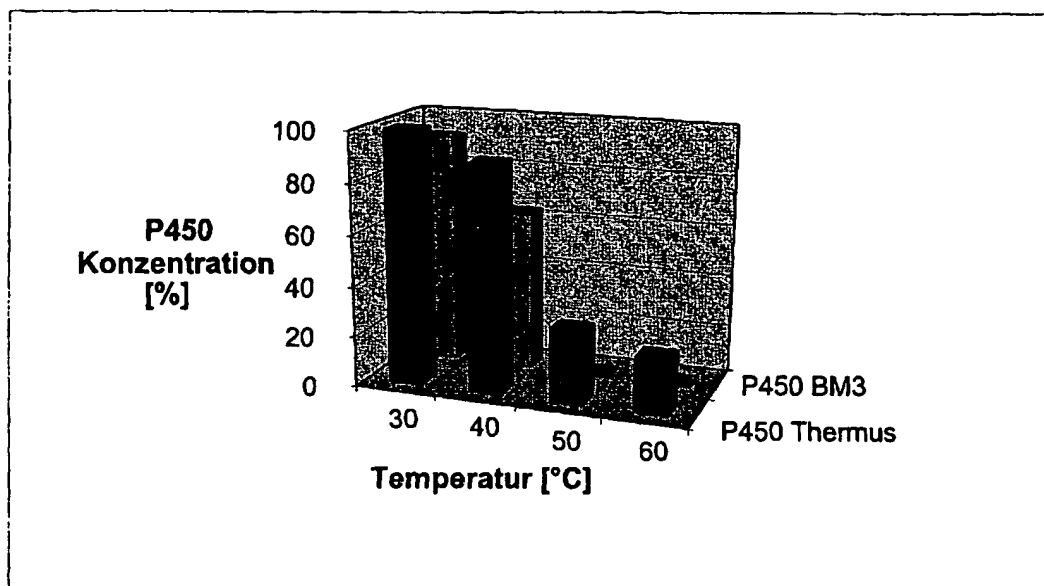
Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

Fig. 1

| | | |
|--------------|--|---|
| □ | | |
| P450 BM3 | | TIKEMPQPKTFGELKNLPLLNTDKPVQALMKIADELGEIFKFEAPGRVTRYLSSQRLIKE 60 |
| □ | | |
| P450 thermus | | -MKRLSLREAWPYLKDLQQD----PLAVLLAWGRAHPRFLPLPRFPLALIFDPE-GVEG 54 :*.:. :*: * :*. :*. :*: :* |
| P450 BM3 | | ACDESRLFQKNSQALKFVRDFAGDGLFTSWTHEKNWKAHNILLPSFSQQAMKGYHAMMV 120 |
| P450 thermus | | ALLAEGTTKATFQYRALSRLTGRGLLTDWG--ESWKEARKALKDPFLPKNVRGYREAME 111 * . * * : * :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* |
| P450 BM3 | | DIAVQLVQKWERLNADEHIEVPEDMTRLTLDITGLCGFNRYRNFSEFYRDQPHPFITSMVRA 180 |
| P450 thermus | | EEARAFFGEWR----GEERDLDEHMLALSRLLLGRALFGKPLSPSLAEH-----ALKA 160 : * :. :*. :*. :*. :* :* :* :* :* :* :* :* |
| P450 BM3 | | LDEAMNKLQRANPDOPAYDENKRQFQEDIKVMNDLVDKIIADRKASGEQSDDLLTHMLNG 240 |
| P450 thermus | | LDRIMAQTR--SPLALLDLAEARFR-----K--DRGALYREAEALIVHPPLS 204 ** * : : * : :* :* :* :* :* :* :* :* |
| P450 BM3 | | KDPETGEPLDDENIRYQIIITFLIAGHETTSGLLSFALYFLVKNPHVLQKAAEEAARVLVD 300 |
| P450 thermus | | HLP-----RERALSEAVTLVAGHETVASALTWSFLLLSHRPDWQKRVAESEEAAALAA 257 : * : * : :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* |
| P450 BM3 | | PVPSYKQVKQLKYVGMVLNEALRLWPTAPAFSLYAKEDTVLGGEYPLEKGDELMVLIPQL 360 |
| P450 thermus | | -----FQEALRLYPWILTRRLERPLLGG-EDRLPPG-TTLVLSPYV 298 : :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* |
| P450 BM3 | | HRDKTIWGDVVEFRPERFENPSAIPQHAFKPFNGGQACIGQOFALHEATLVLGMMMLKH 420 |
| P450 thermus | | TQRLHFP--DGEAFRPERFLEERGTPSGRYFFGLGQRLCLGRDFALLEGPVLRRAFFRR 356 : : * * :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* |
| P450 BM3 | | FDFEDHTNYELDIKETLTLKPEGFVVKAKSKKIPLGGIPS-PSTEQSAKKVR 471 |
| P450 thermus | | FRLDPLP--FPRVLAQVTLRPE-----GGLPARPREEVRA---- 389 * :. : :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* |

Fig.2



BEST AVAILABLE COPY